

## 用酶标受体法检测牛生长激素的生物活性

王大钧 余慕贞 史瀛仙

(中国科学院发育生物学研究所, 北京)

激素的测定对于研究激素有很大的意义。多少年来激素只能借助于生物效应来测活。随着同位素和免疫学方法的发展, 放射免疫分析(RIA)技术已成功地应用于许多人体激素的测定, 此法快速、准确、敏感, 但不足之处是所测得的只是激素分子免疫活性而非生物活性。近年来在RIA基础上又发展了放射受体分析技术(RRA), 此法所测得的激素活性, 应能代表真正生物活性, 但由于此法仍是利用放射性同位素作为检测手段, 条件要求严格, 也比较麻烦。我们根据酶联免疫吸附分析(ELISA)原理, 利用RRA的优点, 用酶标方法代替放射性同位素以避免RRA的缺点, 建立了激素与受体结合的ELISA-RA法测定生长激素生物活性。

### 方法和结果

#### (一) 牛生长激素(bGH)的提取及纯化

参照Wallis<sup>[1]</sup>方法, 将牛垂体在硼酸-盐酸缓冲液(pH8.7)中匀浆, 7000g离心, 取上清透析后经DEAE柱层析纯化, 最后将纯化的bGH过bGH-单克隆抗体-Sepharose 4B免疫亲和层析柱, 得高纯度bGH, 在SDS-PAGE电泳图上呈现单一带, 分子量为22kd(图版I)。

#### (二) bGH的生物检定

参照Greenspan<sup>[2]</sup>经典胫骨方法检测结果, 实验组胫骨板宽度平均298.5 $\mu$ m, 对照组平均为170.8 $\mu$ m ( $P < 0.01$ ), 证明所提纯的bGH具生物活性。

#### (三) ELISA-RA检测法

1. 兔肝受体制剂的制备: 参照Tushima<sup>[3]</sup>方法, 取怀孕后期家兔的肝脏, 剔掉结缔组织, 剪成小块, 放入5倍体积的0.3mol/L蔗糖中匀浆, 匀浆液经8层纱布过滤后, 1500g离心20min, 弃沉淀; 1500g再离心20min, 弃沉淀; 最后

100000g离心90min, 将沉淀溶于0.025mol/L Tris-HCl, 10mol/L NaCl, pH7.6缓冲液中。用Folin-酚试剂测定溶液中蛋白质含量, 稀释成8mg/ml并分装, -80℃保存, 一般可使用3个月。

#### 2. bGH与受体结合的ELISA测定

包被: 取1ml bGH受体粗提物(8mg/ml), 用CBS液作10倍稀释(CBS: 0.5mol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.5mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH9.6), 在聚丙烯酰胺测定板上每孔加入250 $\mu$ l, 4℃过夜。

加激素: 用PBS-T20洗涤3次以除去未吸附的受体制剂, 于每孔内加200 $\mu$ l bGH的PBS溶液, 使与吸附在聚丙烯酰胺板上的肝膜受体结合, 37℃温育2—3h。

加兔抗bGH血清: 经PBS-T20洗涤3次以除去未结合的bGH后, 每孔加兔抗bGH血清(1:2000)200 $\mu$ l, 37℃温育2—3h。

加酶标记的抗体: 经PBS-T20洗涤3次以除去多余的抗血清后, 每孔内加入200 $\mu$ l 1:100辣根过氧化物酶标记的羊抗兔Ig的抗血清, 37℃温育2h。

加酶反应物: 经PBS-T20洗涤3次后, 每孔内加新鲜配制的邻苯二胺和过氧化氢的柠檬酸-磷酸盐缓冲液150 $\mu$ l作为反应底物, 室温下放置30min。

检测: 每孔内加40 $\mu$ l 2mol/L NaOH终止反应, 用Micro ELISA Minireader I (Dynatech) 410nm测吸光值, 结果见图1。从图中可见用肝膜受体包被后, 再加入0.5—10.0 $\mu$ g/ml bGH, 可测得0.5—1.8OD值。在使用bGH浓度范围

本文于1988年12月29日收到。

本文为国家七五计划资助项目, 美国洛氏基金资助项目。

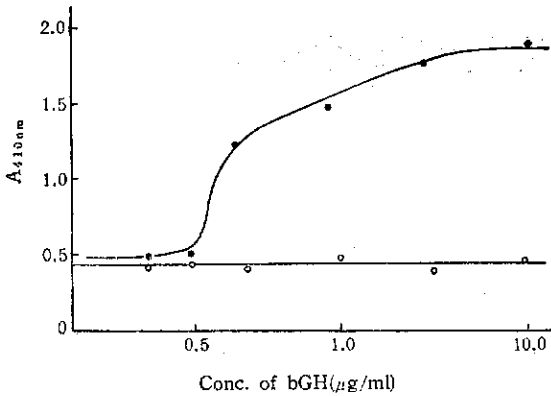


图 1 bGH与受体(●—●)及失活受体(○—○)结合的反应曲线。

内，bGH用量与ELISA反应强度呈比例关系。在用肝膜受体包被而没有加bGH对照孔中，虽也有很弱显色反应，但OD值均在0.4以下。如将肝膜受体加热使之变性，ELISA没有反应。

在实验中受体包被浓度，曾试用1:5, 1:10, 1:50, 1:100不同稀释度，所得结果差异不大，我们选用1:10作为包被浓度。此法测出bGH敏感度为0.5—1.0 $\mu\text{g/ml}$ ，略逊于RRA法，但远较经典生物检定法(50—120 $\mu\text{g}$ )为高。此法不须用同位素标记bGH等繁琐技术及设备，为检测GH活性提供操作简单、快速、敏感、行之有效的新方法。而且ELISA-RA能同时反映bGH的免疫活性和生物活性。

### 参 考 文 献

- [1] Wallis, M.; *Biochemical J.*, 100:593, 1966.  
 [2] Greenapan, F.S.; *Endocrinol.*, 45:455, 1949.  
 [3] Tsushima, T.; *J. Clin. Endocrinol. Meta.*, 37:334, 1973.

## ELISA-RECEPTOR ASSAY FOR TESTING THE BIOACTIVITY OF GROWTH HORMONE

Wang Daijun Yu Muzhen Shi Yingxian

(*Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing*)

According to the principle of the enzyme-linked immunoassay (ELISA), a new method, ELISA-receptor assay (ELISA-RA), for testing the bioactivity of growth hormone was devised. In this ELISA-RA system, the growth hormone which has bound to its receptors can also bind to its antibodies. This method can test both the immunoreactivity and bioactivity of growth hormone in a quick and easy way. The sensitivity of this method is 0.5 $\mu\text{g}$  of growth hormone. In this case, it is supposed that there probably is a difference in the localization between biological activity center and immunoreactivity center or there are more than one bioactivity and immunoreactivity centers in the molecule of growth hormone,

### Key words

Growth hormone; ELISA; receptor; bioassay